

FILLER FOR LIQUID CHROMATOGRAPHY

Patent Number: JP5333015
Publication date: 1993-12-17
Inventor(s): KADODE TAKASHI; others: 06
Applicant(s): NEOS CO LTD
Requested Patent: ☐ JP5333015
Application Number: JP19920160379 19920526
Priority Number(s):
IPC Classification: G01N30/48; B01D15/08; G01N30/88
EC Classification:
Equivalents: JP3206111B2

Abstract

PURPOSE: To make it possible to separate and refine material related organism such as nucleic acid by using silica-based filler containing flourine, which is treated with quarternary ammonium salt expressed by the specified formula.

CONSTITUTION: Silica-based filler containing flourine is treated with quarternary ammonium salt expressed by the formula I and used. (In the formula, R1-R4 indicate the alkyl groups, whose carbon number is 1-30, and can have fluoroalkyl groups. X indicates the anion of inorganic acid, and (a) indicates the integer of 1-3.) Or the filler is treated with quarternary ammonium salt expressed by the formula II. (In the formula, Y1-Y4 are hydrogen atoms or fluorine atoms, and (m), (o), (r) and (s) are 0-12 and all are not 0 at the same time. The letters (n), (p), (q) and (t) indicate the integers of 0-12. X indicates the anion of inorganic acid, and (b) indicates the integer of 1-3.) The silica-based filler containing fluorine is dispersed into solvent such as chloroform. Then the quarternary ammonium is added. Thereafter, an evaporator is used, and the chloroform is removed. Thus, the intended filler can be manufactured.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-333015

(43) 公開日 平成5年(1993)12月17日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 30/48	L	8506-2 J		
B 0 1 D 15/08				
G 0 1 N 30/88	E	8506-2 J		
// C 0 7 K 3/20		7731-4 H		

審査請求 未請求 請求項の数2(全5頁)

(21) 出願番号 特願平4-160379

(22) 出願日 平成4年(1992)5月26日

(71) 出願人 000135265

株式会社ネオス

兵庫県神戸市中央区加納町6丁目2番1号

(72) 発明者 門出 孝志

滋賀県甲賀郡甲西町大池町1番地1 株式会社ネオス内

(72) 発明者 上宇宿 俊郎

滋賀県甲賀郡甲西町大池町1番地1 株式会社ネオス内

(72) 発明者 二雲 加代

滋賀県甲賀郡甲西町大池町1番地1 株式会社ネオス内

最終頁に続く

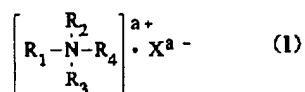
(54) 【発明の名称】 液体クロマトグラフィー用充填剤

(57) 【要約】

【目的】 特に、核酸、ペプチド、蛋白質等の生体関連物質の分離精製に効果的な液体クロマトグラフィー用充填剤を提供することである。

【構成】 含フッ素系充填剤を一般式(1)：

【化1】



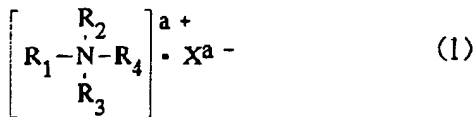
で表される4級アンモニウム塩により処理された液体クロマトグラフィー用充填剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 含フッ素シリカ系充填剤を一般式

(1) :

【化1】



(式中、Y₁, Y₂, Y₃, Y₄は、水素原子、又は、フッ素原子である。m, o, r, sは、0~12ですべてが同時に0ではない。n, p, q, tは0~12の整数を示す。X^{b-}は、無機酸のアニオンを示す。bは、1~3の整数を示す。)で表される4級アンモニウム塩により処理された液体クロマトグラフィー用充填剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は液体クロマトグラフィー用充填剤に関するものであり、とくに核酸、ペプチド、蛋白等の生体関連物質の分離精製に効果を発揮する液体クロマトグラフィー用充填剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 生体関連物質、特に、DNA、RNA断片の分離分析には従来ODSカラムを用いた逆相モード、陰イオン交換カラムを用いたイオン交換モードでの分離分析が知られている。又、上記逆相モードとイオン交換モードをあわせたミックスモードの例として、トリフルオロエチレンポリマーに4級アンモニウム塩をコーティングした充填剤を用いたカラムにより短時間で多数のオリゴヌクレオチドを分離した例が知られている。

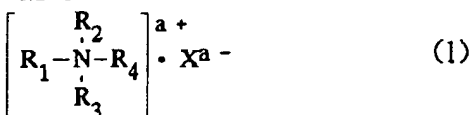
【0003】

【発明が解決しようとする課題】 上記した逆相モードやイオン交換モードでのDNA、RNA断片の分離分析には分離感度が悪いことや分析に長時間を要するなどの問題点がある。ミックスモードでのDNA、RNA断片の分析は短時間で効率的に分離することが可能であるが、カラムの耐久性や理論段数が低い等の問題がある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記問題点を解決するために、含フッ素シリカ系充填剤を、一般式

【化3】

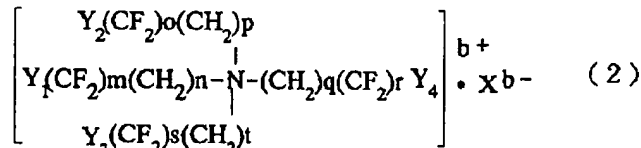


* (式中、R₁, R₂, R₃, R₄は、炭素数1~30のアルキル基を示し、フルオロアルキルを持ってもよい。X^{a-}は、無機酸のアニオンを示す。aは、1~3の整数である。)で表される4級アンモニウム塩によって処理された液体クロマトグラフィー用充填剤。

【請求項2】 含フッ素シリカ系充填剤を一般式

(2) :

【化2】



(式中、R₁, R₂, R₃, R₄は、炭素数1~30のアルキル基を示し、フルオロアルキルを含有してもよい。X^{b-}は、無機酸のアニオンを示し、aは、1~3の整数である。)で示される4級アンモニウム塩で処理された液体クロマトグラフィー用充填剤を提供する。本発明で用いられる含フッ素シリカ系充填剤とは、担体としてシリカゲルを用い、該シリカゲルを含フッ素シリコン化合物(含フッ素修飾剤)により表面処理された充填剤をいう。含フッ素シリカ系充填剤に用いられる担体のシリカゲルの特性は、特に限定するものではないが、形状としては、好ましいのは球状である。又、金属不純物の少ないものが望ましく、好ましくは、シリカ純度が99.9%以上のものを用いることが望ましい。また、シリカゲルの粒子径、細孔径も特に限定されるものではないが、生体高分子の分析には、一般に粒子径3~10μm、細孔径100~300μmのシリカゲルが用いられる場合が多い。

【0005】 ここで用いられる含フッ素修飾剤は、例えば、トリデカフルオロ-1, 1, 2, 2-テトラハイドロオクチルジメチルクロロシラン、ヘプタデカフルオロ-1, 1, 2, 2-テトラハイドロオクチルジメチルクロロシラン、5, 5, 6, 6, 7, 7, 7-ヘプタフルオロ-4, 4-ビス(トリフルオロメチル)-ヘプタジメチルクロロシラン等を用いることができ、シリカゲル表面のシラノール基と化学結合する官能基を持つものであればよい。

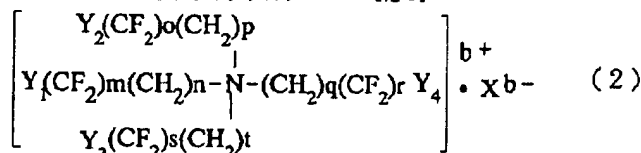
【0006】 シリカゲルを含フッ素シリコン化合物(含フッ素修飾剤)で表面処理する方法には種々あるが、一般的にはトルエンなどの有機溶媒中にシリカゲルを分散させた後、ピリジンと含フッ素修飾剤を添加し、還流下で6~10時間反応させる。次いで、残留しているシラノール基をキャッピングするためにヘキサメチルジシランとトリメチルクロロシランの混合物を用いて同様の方法によりシリカゲルを処理し、エンドキャッピングを行う。

【0007】 一般式(1)で示される4級アンモニウム塩において、R₁, R₂, R₃, R₄は、炭素数1~30の

アルキル基を示す。好ましくは、炭素数1~12のアルキル基である。X^{b-}は、無機酸のアニオンを示す。例えば、ハロゲンイオン、ClO₄⁻、SO₄²⁻、PO₄³⁻等である。一般式(1)の物質を例示するとトリオクチルメ*

*チルアンモニウムクロライド等を挙げられる。

【0008】さらに、一般式(2)に示される含フッ素アルキル基を持つ4級アンモニウム塩が好ましい。【化4】



(式中、Y₁、Y₂、Y₃、Y₄は、水素原子、または、フッ素原子である。m、o、r、sは、0~12で、すべてが同時に0ではない。n、p、q、tは0~12の整数を示す。X^{b-}は、無機酸のアニオンを示す。bは、1~3の整数を示す。)一般式(2)中のY₁、Y₂、Y₃、Y₄は、水素原子、または、フッ素原子である。m、o、r、sは0~12の整数を示し、好ましくは1~8である。n、p、q、tは0~12の整数を示し、好ましくは1~8である。X^{b-}は、無機酸のアニオンを示す。例えば、ハロゲンイオン、ClO₄⁻、SO₄²⁻、PO₄³⁻等である。一般式(2)の物質を例示するとC

F₃CF₂CH₂N(CH₃)₄・Cl等が挙げられる。【0009】含フッ素シリカ系充填剤に4級アンモニウム塩をコーティングする方法は特に限定されないが、一般的には次の方法を用いて処理することにより目的の充填剤を得ることができる。含フッ素シリカ系充填剤を適当な溶媒(例えば、クロロホルム)に分散させ、次いで、4級アンモニウム塩を添加する。その後、エバポレーターを用いてクロロホルムを除去することにより目的の充填剤を得ることができる。

【0010】以下実施例にてさらに詳細に説明する。

【実施例】以下実施例にてさらに詳細に説明する。

(a) 含フッ素シリカ系充填剤の製造

シリカ純度99.99%以上の高純度シリカゲル(粒径5μm、細孔径30)2gをトルエン30mlに懸濁し、5.5.6.6.7.7.7-ヘプタフルオロ-4,4-ビス(トリフルオロメチル)-ヘプタヒドロシラン4gとピリジン3mlを加えて、還流下6時間反応させた。その後、ヘキサメチルジシラザンとトリメチルクロロシランを用いてエンドキャッピングを行った。

【0010】(b) 4級アンモニウム塩コーティング充填剤の製造

(a)で調製した含フッ素シリカ系充填剤4gを500mgのメチルトリオクチルアンモニウムクロライドを含むクロロホルム10mlに懸濁した後エバポレーターでクロロホルムを除去し目的の充填剤を得た。該充填剤をスラリー充填法により内径4.6mm、長さ30mmのステンレス製のカラムに充填した。

【0011】実施例1

(b)で調製した4級アンモニウム塩をあらかじめコーティングした含フッ素シリカ系カラムを用いて、ポリ

デニル酸(ヤマサ社製)をヌクレアーゼP1を用いて加水分解した緩衝溶液を分析した。分析条件はカラム長さ30mm、移動相(A)0.1M酢酸アンモニウム水溶液、及び(B)アセトニトリル水溶液によるグラジエント溶出(B液が5%から30%まで30分)、検出UV(260nm)、流速1.0ml/minである。得られたクロマトグラムを図1に示す。この図から分かるように短時間で30塩基単位まで正確に分離できている。

【0012】実施例2

(b)で調製した4級アンモニウム塩をあらかじめコーティングした含フッ素シリカ系カラムを用いて、ポリデオキシアデニル酸(ファルマシア社製)の各種ベースポリマーの水溶液を分析した。分析条件はカラム長さ30mm、移動相(A)0.1mM過塩素酸ソーダ+10mMトリス酢酸バッファー(pH7.5)+1mMEDTA、及び(B)0.5M過塩素酸ソーダ、10mMトリス酢酸バッファー(pH7.5)+1mMEDTAによるグラジエント溶出(B液が13%から40%まで120分)、検出UV(260nm)、流速1.0ml/minである。得られたクロマトグラムを図2に示す。この図から分かるように短時間で全てのベースポリマーを正確に分離できた。

【0013】比較例1

市販のODSカラムを用いて、ポリアデニル酸(ヤマサ社製)をヌクレアーゼP1を用いて加水分解した緩衝溶液を分析した。分析条件はカラム長さ30mm、移動相(A)0.1M酢酸アンモニウム水溶液、及び(B)アセトニトリル水溶液によるグラジエント溶出(B液が5%から30%まで30分)、検出UV(260nm)、流速1.0ml/minである。得られたクロマトグラムを図3に示す。この図から分かるように30塩基単位まで分離するには長時間を必要とし、分離精度も悪い。

【0014】

【発明の効果】本発明による4級アンモニウム塩により処理された含フッ素シリカ系充填剤を液体クロマトグラフィー用の充填剤として用いることにより、核酸、ペプチド、タンパク質等の生体関連物質を短時間に分離精製することが可能となった。

【0015】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1のクロマトグラム。

2

(4)

特開平5-333015

5

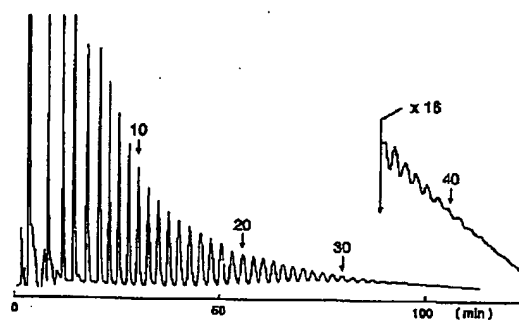
6

【図2】実施例2のクロマトグラム。

【図3】比較例1のクロマトグラム。

【図1】

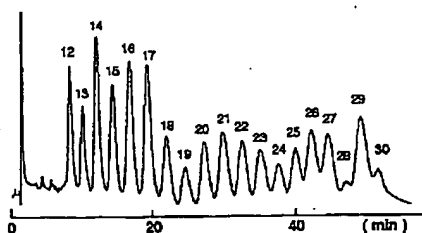
Mixed-Mode HPLC Separation of Poly(A) Enzymatic Partial Hydrolysate



Column ; TOMA coated Rt-Bond K300 (30 mm x 4.6 mm I.D.)
 Eluent ; (A) 10 mM sodium perchlorate + 10 mM Tris-acetate buffer (pH 7.5) + 1mM EDTA
 (B) 0.5 M sodium perchlorate + 10 mM Tris-acetate buffer (pH 7.5) + 1mM EDTA
 Flow rate ; 1.0 ml/min, Detection ; UV-280 nm, Gradient ; (B) 0 % to 100 % for 150 min

【図2】

Mixed-Mode HPLC Separation of The Mixture of Poly(dA)₁₂₋₁₈, Poly(dA)₁₉₋₂₄, and Poly(dA)₂₅₋₃₀



Column ; TOMA coated Rt-Bond K300 (30 mm x 4.6 mm I.D.)
 Eluent ; (A) 10 mM sodium perchlorate + 10 mM Tris-acetate buffer (pH 7.5) + 1mM EDTA
 (B) 0.5 M sodium perchlorate + 10 mM Tris-acetate buffer (pH 7.5) + 1mM EDTA
 Flow rate ; 1.0 ml/min, Detection ; UV-280 nm, Gradient ; (B) 13 % to 40 % for 120 min

(72)発明者 油野 智子
滋賀県甲賀郡甲西町大池町1番地1 株式
会社ネオス内

(72)発明者 中部屋 喜弘
兵庫県神戸市中央区加納町6丁目2番1号
株式会社ネオス内

(72)発明者 二村 典行
東京都港区白金5丁目2番1号

(72)発明者 伊藤 裕子
東京都港区白金5丁目2番1号

THIS PAGE BLANK (USPTO)